



CENTRO DE  
VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA  
Universidad Complutense



# GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA PPA MEDIANTE PCR CONVENCIONAL

[jmvizcaino@visavet.ucm.es](mailto:jmvizcaino@visavet.ucm.es)  
Av/ Puerta de Hierro s/n.  
28040 Madrid.

Tel: (34) 913944082  
Fax: (34) 913943908

## **GENOTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (PPA)**

### **\*Equipamiento requerido**

- Bloque calefactor o baño de agua
- Agitador de tubos o mezclador de vórtice
- Microcentrífuga para tubos eppendorf
- Termociclador convencional con tapa calefactable
- Bandeja para geles de agarosa horizontales, tanque, peines y cables de polvo
- Transiluminador UV
- Microondas
- Nevera a 4°C
- Congelador de -20°C o inferior

### **\* Material de laboratorio general**

- Guantes de látex o nitrilo
- Marcador permanente
- Bandeja con hielo
- Blanqueador al 50%
- Gradillas para tubos de 10 ml
- Gradillas para tubos de microcentrífuga

# 1. PCR CONVENCIONAL

## 1.1 MATERIALES Y REACTIVOS

- Micropipetas de volúmenes 1-20, 20-200 y 200-1000  $\mu$ l
- Puntas de micropipeta con filtro resistente a aerosoles de 1-20, 20-200 y 200-1000  $\mu$ l
- Tubos de microcentrífuga de volúmenes 0,2 y 1,5 ml estériles
- H<sub>2</sub>O estéril libre de nucleasas, grado PCR.
- Mezcla maestra de PCR Platinum™ Green Hot Start (2x) (ThermoFisher Invitrogen™)
- Tres conjuntos diferentes de cebadores a una concentración de 10 pmol /  $\mu$ l:
  - p72- U [5' - GGCACAAGTTCGGACATGT - 3']
  - p72-D [5' - GTACTGTAACGCAGCACAG- 3']
  - PPA89 [5' - TGTAATTCATTGCGCCACAAC - 3']
  - PPA722 [5' - CGAAGTGCATGTAATAAACGTC - 3']
  - CVR1 [5' - ACTTTGAAACAGGAAAC (AT) AATGATG -3']
  - CVR2 [5' - ATATTTGTAATATGTGGGCTGCTG- 3']
- Controles positivos de ADN de ASFV

### Para electroforesis en gel:

- Agarosa (por ejemplo, Biotools ref: 20.012)
- TAE 1XBuffer (p. Ej., Tampón TAE premezclado, 10X, referencia de Roche Diagnostics: 1166669001)
- SYBR Safe (ref. Invitrogen: S33102-400  $\mu$ l) o bromuro de etidio
- Búfer de carga 10X. Por ejemplo:
  - Xinecianol (MERCK, ref: 110590.0005) ----- 0.02gr
  - Azul de Bromofenol (PANREAC, ref: 251165.1604) ----- 0.02gr
  - Glicerol (PANREAC, ref: 131339.1211) ----- 3ml
  - Agua destilada----- 7ml
- Marcador de peso de ADN para amplicones de 257 pb (por ejemplo, Biotools, ref: 31.006 o Roche Diagnostics, ref: 0.019-1.11)

## 1.2 METODOLOGÍA

## **A) AMPLIFICACIÓN DEL ADN**

### **A.1 PREPARACIÓN DE LA MEZCLA MAESTRA:**

- En un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml, prepare la mezcla de reacción de PCR que se describe a continuación para el número de muestras que se van a analizar (incluidos los controles de reacción positivos y negativos). Realice los cálculos que incluyan al menos una muestra adicional debido a los errores de pipeteo.

- Prepare tres mezclas de PCR diferentes para una muestra:

### **VOLUMEN DE REACTIVOS**

(Reacción de 25  $\mu$ l)

H<sub>2</sub>O 9,5  $\mu$ l

Master Mix\_Platinum 12,5  $\mu$ l

Imprimación p72- U 10  $\mu$ M 0,5  $\mu$ l

cebador p72- D 10  $\mu$ M 0,5  $\mu$ l

### **VOLUMEN DE REACTIVOS**

(Reacción de 25  $\mu$ l)

H<sub>2</sub>O 9,5  $\mu$ l

Master Mix\_Platinum 12,5  $\mu$ l

Cebador PPA89 10  $\mu$ M 0,5  $\mu$ l

cebador PPA722 10  $\mu$ M 0,5  $\mu$ l

### **VOLUMEN DE REACTIVOS**

(Reacción de 25  $\mu$ l)

H<sub>2</sub>O 9,5  $\mu$ l

Master Mix\_Platinum 12,5  $\mu$ l

Cebador CVR1 10  $\mu$ M 0,5  $\mu$ l

cebador CVR2 10  $\mu$ M 0,5  $\mu$ l

A.2 Añada 23  $\mu$ l de la mezcla de reacción de PCR al número requerido de tubos de PCR de 0,2 ml.

A.3 Añada 2  $\mu$ l de plantilla de ADN (muestra) a cada tubo de PCR. Incluya un control de reacción positivo (2  $\mu$ l de ADN) y un control negativo (2  $\mu$ l de agua destilada) para cada ciclo de PCR.

A.4 Cerrar los tubos de reacción y mezclar el contenido.

A.5 Coloque todos los tubos en un termociclador automático equipado con tapa térmica. Ejecute el programa de incubación que se detalla a continuación:

Activación de la polimerasa	94°C --- 2min
Desnaturalización del ADN	94°C --- 30 segundos
Ciclos de amplificación	55°C --- 30 segundos x 35 ciclos
Alargamiento del ADN	72°C --- 1 min
Paso de alargamiento adicional	72°C --- 5min.
Mantener a 4°C	

## **B) ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA:**

B.1 Peso de 2 gr de agarosa para preparar un gel de agarosa al 2%

B.2 Añadir 2 gr de agarosa en 100 ml de Tampón TAE 1x

B.3 Caliente la solución en el microondas hasta que la agarosa se derrita por completo.

B.4 Añada 10 µl de SYBR safe por cada 100 µl de agarosa. Agite con cuidado para dispersar.

B.5 Preparar la bandeja de gel, sellando los extremos y colocando el número adecuado de peines. Vierta la agarosa derretida en la bandeja de gel. Espere hasta que el gel se solidifique (aprox. 20 minutos).

B.6 Retire con cuidado el sello de la bandeja y colóquelo en el tanque. Retire con cuidado los peines. Agregue tampón TAE 1X al tanque hasta que el gel esté completamente cubierto por la solución TAE.

B.7 Añada 2,5 µl de tampón de carga 10X a cada tubo.

B.8 Cargue 10 µl de cada muestra de PCR en cada pocillo del gel.

B.9 Añada 10 µl de marcador de peso de ADN molecular a un pocillo de cada carril del gel.

B.10 Conecte la fuente de alimentación. Ejecute el gel a un voltaje constante de 120-130 voltios durante aproximadamente 30 minutos. (Las muestras de ADN deben moverse hacia el electrodo positivo)

B.11 Para la lectura del gel colóquelo en un transiluminador ultravioleta.

### 1.3 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Una muestra positiva presentará una banda discreta que debería haber co-migrado con el producto de PCR del control positivo. El marcador de peso molecular debe utilizarse como referencia para calcular el peso molecular del producto. El procedimiento será válido si tanto los controles positivos de extracción como los de reacción dan una banda discreta del tamaño apropiado correspondiente al amplicón de ADN de ASFV, y los controles negativos de extracción y reacción no dan un patrón de bandas.

Los cebadores p72 U / D amplifican un fragmento de ~ 478 pb w

